

学位授与番号	医博乙第1535号
学位授与年月日	平成13年6月20日
氏 名	大 家 理 恵
学位論文題目	Detection of Differentially Expressed Genes in Esophageal Carcinoma Using Non-RI Differential Display with High Specificity (高感度非 RI ディフференシャルディスプレイを用いた食道癌における癌関連遺伝子の検出)
論文審査委員	主 査 教 授 馬 淵 宏 副 査 教 授 山 本 博 教 授 磨 伊 正 義

内容の要旨及び審査の結果の要旨

発癌に遺伝子の点変異、転座、増幅などのゲノムレベルの変化が関わることはよく知られているが、近年ゲノムに変化なしに RNA レベルで様々の変化が起っていることが注目されるようになった。本研究では食道癌において発現量が変化する mRNA の検出を通じて、食道癌の特性を明らかにすることを目的とした。複数の組織間での RNA 量的変化を検出するために考案された Differential display (以下 dd) を用いたが、放射性標識を用いる従来法は高感度である反面再現性が低く、遺伝子検出までに多くの時間とコストを要することが問題であった。そこで、従来法を改良した方法を用いてヒト食道癌において癌化に伴い発現変化する 4 個の遺伝子を得ることができた。

即ち、PCR 反応中の放射性標識を避け、一般の PCR 反応に用いられる dNTP 濃度(100uM)で PCR を行った後、非変性条件下で電気泳動後サイバークリーン染色した。十分量の dNTP 濃度と RI による polymerase 活性阻害の回避により PCR の安定性が増した。また、PCR 産物は減衰しないため保存・再泳動可能であった。複数症例より抽出した RNA を同時に解析することで、dd 産物を混淆なく選別することが可能になり、全ての症例で再現性よく変化している遺伝子を回収できた。

結果として、20 種の任意プライマーを用いて行った ddPCR で、14 個の異なる cDNA が得られ、再増幅後 8 個がクローニングされた。配列解析により、未知遺伝子 3 個、EST 2 個の他、サイトケラチン 4 (CK4)、第 7 補体成分(C7)、KIAA1160 蛋白であると同定された。未知を除く 5 種の遺伝子断片について、10 対の正常-腫瘍組織 RNA において定量的 RT-PCR を用いて発現変化を再確認したところ、EST1 個を除き発現変化が確かめられた。

さらに非角化性粘膜上皮特異蛋白とされている CK 4 について in situ hybridization を用いて局在をみたところ、正常粘膜の基底細胞層には発現せず、基底層上層に検出され、癌では全く発現が見られなかった。従って、CK 4 の発現低下は癌における転写レベルでの分化プログラムの破綻を示していると考えられた。

本研究は、mRNA 発現の側面から食道癌の特性をの一旦を明らかにしただけでなく、dd 法の改良という分子生物学的にも意義ある研究として評価された。